

Best Available Copy

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

30. 06. 2004

PCT/EP04/ 4981

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 16 JUL 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 20 869.0

Anmeldetag:

09. Mai 2003

Anmelder/Inhaber:

Evotec Technologies GmbH,
40225 Düsseldorf/DE

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtungen zur
Flüssigkeitsbehandlung suspendierter
Partikel

IPC:

B 01 J, G 01 N, C 12 M

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. Mai 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Verfahren und Vorrichtungen zur Flüssigkeitsbehandlung suspendierter Partikel

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Behandlung mindestens eines Partikels mit mindestens einer Reaktionsflüssigkeit in einem fluidischen Mikrosystem, insbesondere Verfahren zur Flüssigkeitsbehandlung, bei denen mindestens ein suspendierter Partikel im Kanal eines fluidischen Mikrosystems in einer Halteinrichtung fixiert ist, durch die die mindestens eine Reaktionsflüssigkeit hindurchströmt, und Vorrichtungen zur Umsetzung derartiger Verfahren.

Es ist bekannt, suspendierte Partikel in fluidischen Mikrosystemen z. B. für bestimmte Messungen, Sortierungen, Analysen, Reaktionsabläufe oder dergleichen unter der Wirkung insbesondere von elektrischen und/oder magnetischen Feldern zu manipulieren. Die Partikel umfassen allgemein Mikroobjekte mit typischen Dimensionen im Sub-mm-Bereich, wie z. B. biologische Zellen, synthetische Partikel oder in Systemen mit getrennten flüssigen Phasen flüssige Tröpfchen. Das Mikrosystem umfasst mindestens einen Hauptkanal, durch den die Partikel mit einer Trägerflüssigkeit bewegt werden und in dem z. B. zur Erzeugung von elektrischen Feldern Elektroden angeordnet sind. Bei Beaufschlagung der Elektroden mit hochfrequenten elektrischen Feldern können die Partikel unter der Wirkung negativer Dielektrophorese beispielsweise vereinzelt, fokussiert, sortiert, einzeln ortsfest positioniert oder in Gruppen geparkt werden (siehe T. Müller et al. in "Biosensors & Bioelectronics", Band 14, 1990, Seite 247-256, und in "Bioworld", Band 2/2, 2000, Seite 12-13).

Eine spezielle Aufgabe bei der Manipulation von Partikeln in Mikrosystemen besteht darin, dass die suspendierten Partikel neben der Trägerflüssigkeit zusätzlich einer Behandlungsflüs-

sigkeit (im Folgenden: Reaktionsflüssigkeit) ausgesetzt werden. Die Behandlung mit der Reaktionsflüssigkeit kann beispielsweise der Auslösung von spezifischen chemischen Reaktionen oder Waschzwecken dienen.

Von G. Gradl et al. wird in der Publikation "New Mikrodevices for Single Cell Analysis, Cell Sorting and Cloning-on-a-Chip: The Cytocon™ Instrument" (A.v.d. Berg et al. (Herausgeber): Micro Total Analysis Systems" 2000, Seite 443-446, Kluwer Academic Publishers)) ein fluidisches Mikrosystem beschrieben, bei dem zur Flüssigkeitsbehandlung von Partikeln ein Hauptkanal von einem Querkanal senkrecht gekreuzt wird, durch den die Reaktionsflüssigkeit geleitet wird. In Figur 10 ist die Kreuzung des Hauptkanals 30' mit dem Querkanal 31' schematisch illustriert. Am Kreuzungspunkt ist als Halteeinrichtung 50' eine Anordnung von acht Mikroelektroden 51' (Oktopol-Elektrodenanordnung) zur Erzeugung eines dielektrischen Feldkäfigs vorgesehen. Zur Flüssigkeitsbehandlung werden Partikel 10', 11' mit der Trägerflüssigkeit im Hauptkanal 30' bis zur Halteeinrichtung 50' transportiert und einzeln im Feldkäfig gehalten, der durch die Halteeinrichtung 50' erzeugt wird. Durch den Querkanal 31' wird die Reaktionsflüssigkeit durch die Halteeinrichtung 50' gespült. Die in der Publikation von G. Gradl et al. beschriebene Technik kann bei bestimmten Anwendungen in Bezug auf die folgenden Probleme nachteilig sein.

Im dielektrischen Feldkäfig der Oktopol-Elektrodenanordnung werden relativ geringe dielektrische Haltekräfte ausgebildet (z. B. < 100 pN), was in Abhängigkeit von der Art des behandelten Partikels (z.B. biologische Zelle, synthetisches Teilchen) eine sehr gleichmäßige Strömung mit nicht allzu hohen Strömungsgeschwindigkeiten (< 300 $\mu\text{m/s}$) erfordert. Der Querkanal 31' muss mit zusätzlichen Pumpen und insbesondere pulsationsfreien und totvolumenfreien Ventilen ausgestattet sein. Dadurch wird die Möglichkeit zur Parallelisierung (gleichzeitige

Behandlung einer Vielzahl von Partikeln) und die Betriebszuverlässigkeit beschränkt. Ein weiteres Problem kann darin bestehen, dass ggf. vor dem gewünschten Beginn einer Flüssigkeitsbehandlung bereits ein Teil der noch ruhenden Reaktionsflüssigkeit aus dem Querkanal 31' in die Halteeinrichtung 50' diffundiert. Die Wirkung der quer zur Trägerflüssigkeit diffundierenden Reaktionsflüssigkeit kann zwar durch eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vermindert werden. Allerdings ist aus den obengenannten Gründen die Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit nur beschränkt möglich. Kinetische Untersuchungen, bei denen die Zeitabhängigkeit der Reaktion des Partikels 11' auf die Reaktionsflüssigkeit erfasst werden soll, sind daher mit dem herkömmlichen System nur beschränkt möglich.

Aus der Publikation von T. Müller et al. (siehe oben) ist bekannt, im Kanal 30' des fluidischen Mikrosystems mit sogenannten Parkelektroden gekrümmte Feldbarrieren quer zur Kanalrichtung zu erzeugen, mit denen suspendierte Partikel vom weiteren Transport mit der Trägerflüssigkeit zurückgehalten werden können. Parkelektroden 52', die beispielhaft in Figur 11 gezeigt sind, besitzen eine dreieck- oder trapezförmige Form, so dass sich in Strömungsrichtung Potentialtöpfe bilden, in denen sich die Partikel 12' sammeln. Die herkömmlichen Parkelektroden besitzen den Nachteil, dass sie nicht für eine ortsfeste Positionierung einzelner Partikel geeignet sind, da sie kein definiertes Potentialminimum bilden. Vielmehr bilden die Partikel 12' in den Potentialtöpfen unregelmäßige Aggregate 13', so dass lokal definierte Messungen oder Bearbeitungsschritte ausgeschlossen sind. Spezifische Behandlungen können erst nach einer Freigabe von der Parkelektrode und erneuter Vereinzelnung unter der Wirkung von Dielektrophorese erfolgen. Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren und Vorrichtungen zur Behandlung suspendierter Partikel mit mindestens einer Reaktionsflüssigkeit in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems bereitzustellen, mit denen die Nachteile der herkömmlichen Flüs-

sigkeitsbehandlung überwunden werden. Erfindungsgemäße Verfahren sollen sich insbesondere durch ein sicheres und zuverlässiges Positionieren einzelner Partikel in einer Halteeinrichtung auszeichnen und kinetische Untersuchungen mit einem definierten Beginn der Behandlung mit der Reaktionsflüssigkeit ermöglichen. Erfindungsgemäße Vorrichtungen sollen insbesondere eine vereinfachte Elektrodenstruktur besitzen und eine homogenere Behandlung von Partikeln ermöglichen. Generell soll die Anwendung der Flüssigkeitsbehandlung in Bezug auf höhere Geschwindigkeiten der Trägerflüssigkeit erweitert werden. Die erfindungsgemäß behandelten Partikel sollen am Ort der Behandlung (in der Halteeinrichtung) optischen Messverfahren zugänglich sein.

Diese Aufgaben werden durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 13, 26 und 29 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Verfahrensbezogen basiert die Erfindung auf der allgemeinen technischen Lehre, die Behandlung von mindestens einem suspendierten Partikel mit mindestens einer Reaktionsflüssigkeit mit einem räumlichen Abstand vom Ort der Zuführung der Reaktionsflüssigkeit in eine Trägerflüssigkeit, in der der Partikel suspendiert ist, durchzuführen. Die Reaktionsflüssigkeit strömt von einem Seitenkanal in den Hauptkanal mit der Trägerflüssigkeit und trifft erst stromabwärts nach der Ankopplung des Seitenkanals auf den mindestens einen Partikel. Durch diese Maßnahme wird die Zuführung der Reaktionsflüssigkeit strömungstechnisch vereinfacht. An die Gleichförmigkeit der Zuführung der Reaktionsflüssigkeit werden geringere Anforderungen gestellt. Die genannten Probleme durch eine unerwünschte Diffusion der Reaktionsflüssigkeit werden vermieden. Beschränkungen in Bezug auf die Gestaltung der Halteeinrichtung, die bei der herkömmlichen Anordnung am Kreuzungspunkt gegeben waren, werden

vermieden. Die Halteeinrichtung kann für eine effektive Fixierung von Partikeln mit erhöhter Haltekraft eingerichtet werden.

Die Erfindung ermöglicht es insbesondere, die Halteeinrichtung so zu gestalten, dass der mindestens eine Partikel einzeln gehalten oder eine Vielzahl von Partikeln nebeneinander als gerade oder gekrümmte Reihe entlang einer Potentiallinie positioniert werden, die sich quer zur Strömungsrichtung über den Hauptkanal erstreckt. Wenn der mindestens eine Partikel an einem lokalen, im Wesentlichen punktförmigen Potentialminimum oder entlang der Potentiallinie gehalten wird kann vorteilhafterweise die Bildung von undefinierten Aggregaten oder Klumpen wie bei den herkömmlichen Parkelektroden vermieden wird. Allgemein bedeutet die Halterung an einem Potentialminimum oder entlang einer Potentiallinie, dass der Ort der maximalen Haltekraft auf einen Punkt oder eine Linie fokussiert ist. Die Haltekraft können insbesondere bei der Verwendung von negativer oder positiver Dielektrophorese in Bezug auf die Elektroden entsprechend abstoßende oder anziehende Kräfte oder bei der Verwendung optischer Halteeinrichtungen (nach dem Prinzip von Laserpinzetten) optische Kräfte sein, die im jeweiligen Fokus maximal sind.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der mindestens eine Partikel stromabwärts von der Mündung des Seitenkanals in den Hauptkanal außerhalb der Mitte des Hauptkanals auf dessen Seite gehalten ist, die von der Kanalwand begrenzt wird, in der die Mündung des Seitenkanals gebildet ist (Halterung in der mündungsseitigen Hälfte des Hauptkanals). In diesem Fall tritt die Reaktionsflüssigkeit vorteilhafterweise im Wesentlichen ohne eine Durchmischung mit der Trägerflüssigkeit durch die Halteeinrichtung.

Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung kann die Halteeinrichtung in der Mitte des Hauptkanals vorgesehen

sein, was insbesondere von Vorteil ist, wenn mehrere Reaktionsflüssigkeiten über mehrere Seitenkanäle von verschiedenen Seiten in den Hauptkanal zugeführt werden.

Der mindestens eine Partikel wird in der Halteeinrichtung vorzugsweise unter der Wirkung von dielektrophoretischen, optischen oder mit Ultraschall erzeugten Haltekräften gehalten. Vorteilhafterweise sind die hierzu erforderlichen Quellen, wie z.B. Elektrodenanordnungen zur Erzeugung von Feldbarrieren, optische Laserpinzetten oder Schallquellen aus der herkömmlichen fluidischen Mikrosystemtechnik an sich verfügbar. Vorteilhafterweise kann die Gestaltung der Halteeinrichtung vereinfacht werden, wenn der Partikel unter der kombinierten Wirkung dielektrophoretischer Haltekräfte und mechanischer Strömungskräfte gehalten wird. In diesem Fall muss lediglich eine gerade oder gekrümmte Feldbarriere erzeugt werden, die sich über den Hauptkanal erstreckt.

Wenn sich die Feldbarriere in Längsrichtung des Hauptkanals bis zum lokalen Potentialminimum verengt, können sich Vorteile für die Halterung einzelner Partikel ergeben. Es kann insbesondere eine sogenannte Hexoden-Elektrodenanordnung vorgesehen sein, die im Vergleich zu den herkömmlich im Kreuzungspunkt von Kanälen verwendeten Feldkäfigen einfacher handhabbar ist, da für eine stabile Halterung des zu behandelten Partikels weniger Elektroden erforderlich sind als bei der Oktopol-Elektrodenanordnung. Wenn sich die Feldbarriere linear quer zur Längsrichtung des Hauptkanals erstreckt, können vorteilhafterweise viele Partikel gleichzeitig als gerade Linie gehalten werden. Gemäß einer bevorzugten Variante der Erfindung wird die Flüssigkeitsbehandlung des mindestens einen Partikels in der Halteeinrichtung mit einer Messung von Partikeleigenschaften kombiniert. Die Messung umfasst beispielsweise eine elektrische Messung (z. B. Impedanzmessung, Rotationsmessung), eine optische

Messung (z. B. Fluoreszenzmessung) und/oder eine optische Abbildung mit einem Mikroskop.

Gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung ist vorgesehen, dass parallel zur Flüssigkeitsbehandlung des mindestens einen Partikels mindestens ein Referenzpartikel in einer Referenz-Halteeinrichtung gehalten wird, in der der Referenzpartikel ausschließlich der Trägerflüssigkeit (ohne die Reaktionsflüssigkeit) oder einer anderen Reaktionsflüssigkeit als der untersuchte Partikel ausgesetzt wird. Dies ermöglicht den Vergleich der Reaktion eines untersuchten Partikels mit dem Referenzpartikel. Zum Vergleich beider Objekte wird vorzugsweise mindestens eine Vergleichsmessung am Referenzpartikel durchgeführt und mit der Messung am untersuchten Partikel verglichen.

Wenn die Reaktionsflüssigkeit als segmentierte Flüssigkeitssäule eingespült wird, in der sich Segmente der Reaktionsflüssigkeit und Segmente einer Barrierenflüssigkeit abwechseln, können sich Vorteile für kinetische Untersuchungen ergeben. Mit der Barrierenflüssigkeit kann vorteilhafterweise eine vorzeitige Diffusion aus der Reaktionsflüssigkeit in den Hauptkanal unterbunden oder die Zuführung der Reaktionsflüssigkeit entsprechend einem bestimmten Zeitplan umgesetzt werden.

Besondere Vorteile der Erfindung können sich ergeben, wenn der Abstand der Positionierung des mindestens einen Partikels von der Mündung des Seitenkanals zur Einführung der Reaktionsflüssigkeit im Bereich von 50 μm bis 4 mm, insbesondere von 50 μm bis 2 mm gewählt ist. In diesem Abstandsbereich können einerseits die genannten Diffusionsprobleme und andererseits eine vorzeitige Vermischung der Reaktions- und Trägerflüssigkeiten vermieden werden. Je nach Anwendungsfall können auch größere Abstände, z. B. 6 mm oder mehr, vorgesehen sein.

Vorrichtungsbezogen basiert die Erfindung auf der allgemeinen technischen Lehre, dass in einem fluidischen Mikrosystem mit einem Hauptkanal für die Trägerflüssigkeit mit mindestens einem suspendierten Partikel, mindestens einem Seitenkanal für mindestens eine Reaktionsflüssigkeit, der in den Hauptkanal mündet und einer Halteeinrichtung für die mindestens zeitweilige Fixierung des Partikels die Halteeinrichtung stromabwärts nach der Mündung des Seitenkanals in den Hauptkanal anzuordnen. Durch die Einführung eines Abstandes zwischen der Mündung des Seitenkanals und der Halteeinrichtung, mit der der mindestens eine Partikel ohne Berührung mit Kanalwänden insbesondere einzeln an einem lokalen Potentialminimum oder als Reihe an einer Potentiallinie fixiert werden kann, wird vorteilhafterweise eine größere Variabilität bei der Gestaltung der Halteeinrichtung für eine Fixierung der Partikel mit einer erhöhten Haltekraft ermöglicht.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst die Halteeinrichtung eine Elektrodenanordnung, mit der ein wenigstens in Strömungsrichtung der Trägerflüssigkeit geschlossener Potentialtopf erzeugt wird. Im punktförmigen Potentialminimum des Potentialtopfs können einzelne Partikel unter Zusammenwirkung von mechanischen Strömungskräften und dielektrophoretischen Kräften besonders wirksam fixiert werden. Der Potentialtopf kann an sich mit der herkömmlichen Oktopol-Elektrodenanordnung erzeugt werden. Bevorzugt wird jedoch eine abgewandelte Elektrodenanordnung, bei der auf der stromabwärts gelegenen Seite der Halteeinrichtung mittig eine Elektrode angeordnet ist. Vorteilhafterweise kann damit die Haltekraft entgegen der Strömungsrichtung der Trägerflüssigkeit oder der Reaktionsflüssigkeit wirksam erhöht werden.

Es ist vorzugsweise eine sogenannte Hexoden-Elektrodenanordnung vorgesehen, die je drei Elektroden auf einer Boden- und einer Deckfläche des Hauptkanals umfasst. Zwei der Elektroden ragen

zur lateralen Abgrenzung des Potentialtopfs von zwei Seiten in den Hauptkanal, so dass zwischen den jeweiligen freien Enden ein Abstand gebildet wird. Die dritte Elektrode ist stromabwärts von den beiden seitlichen Elektroden in der Mitte des zwischen den seitlichen Elektroden gebildeten Abstandes angeordnet. Mit der Hexoden-Elektrodenanordnung, die einen unabhängigen Gegenstand der Erfindung darstellt, kann die Strömungsgeschwindigkeit der Träger- und Reaktionsflüssigkeiten im Vergleich zu herkömmlichen fluidischen Mikrosystemen erheblich erhöht werden.

Die Haltekraft der Hexoden-Elektrodenanordnung kann vorteilhafterweise weiter erhöht werden, wenn am freien Ende der Mittelelektrode eine feldformende Struktur gebildet ist. Weitere Vorteile für die Formung des Potentialtopfs können sich ergeben, wenn zusätzlich stromaufwärts von der Hexoden-Elektrodenanordnung eine feldformende Zusatzelektrode angeordnet ist.

Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung umfasst die Halteeinrichtung mindestens ein Paar Elektroden in Form gerader Elektrodenstreifen, die an den Boden- und Deckflächen des Hauptkanals angeordnet sind. Durch Beaufschlagung der geraden, streifenförmigen Elektroden mit hochfrequenten Wechselspannungen kann vorteilhafterweise eine dielektrische Feldbarriere erzeugt werden, die sich senkrecht zur Strömungsrichtung quer über den Hauptkanal erstreckt. Durch die Zusammenwirkung dielektrophoretischer Kräfte und mechanischer Strömungskräfte werden die Partikel überraschenderweise aufgereiht positioniert. Die gehaltenen Partikel sind quer zur Strömungsrichtung nebeneinander in einer geraden Reihe angeordnet. Dies ermöglicht Einzelmessungen, selbst wenn mit der erfindungsgemäßen Flüssigkeitsbehandlung eine Vielzahl von Partikeln gleichzeitig behandelt werden.

Die Elektroden jeweils eines Paares von Elektrodenstreifen können einander gegenüberliegend angeordnet sein. Vorteilhafterweise kann damit die Feldwirkung verbessert werden. Alternativ können die Elektroden eines Paares in Strömungsrichtung versetzt angeordnet sein. In diesem Fall können sich Vorteile in Bezug auf die Anordnung von zwei Partikelreihen einerseits nahe der Bodenfläche und andererseits nahe der Deckfläche des Hauptkanals ergeben.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Mikrosystem mit mindestens einer Messeinrichtung zur Vermessung des mindestens einen Partikels in der Halteeinrichtung ausgestattet. Vorteilhafterweise kann mit einer z. B. optischen oder elektrischen Messung im Echtzeitbetrieb die Reaktion des Partikels auf die Reaktionsflüssigkeit detektiert und ausgewertet werden. Für Vergleichsuntersuchungen kann es vorteilhaft sein, wenn das Mikrosystem des Weiteren mit einer Referenz-Halteeinrichtung für mindestens ein Referenzpartikel und einer Referenz-Messeinrichtung ausgestattet ist.

Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform kann die Halteeinrichtung für eine Partikelfixierung im Fokus eines akustischen Feldes eingerichtet sein. In diesem Fall umfasst die Halteeinrichtung mindestens eine Schallquelle zur Ultraschallerzeugung.

Die Hexoden-Elektrodenanordnung zur Halterung mindestens eines suspendierten Partikels in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems stellt einen unabhängigen Gegenstand der Erfindung dar. Die Hexoden-Elektrodenanordnung umfasst mindestens drei Elektroden mit einer Zentralelektrode und zwei Seitenelektroden, die zur Erzeugung eines gegen die Strömungsrichtung im Kanal geöffneten Potentialtopfes mit einem Potentialminimum zusammenwirken. Die Zentralelektrode ist dazu eingerichtet, bei Beaufschlagung mit einer hochfrequenten Wechselspannung eine dielektrische Feldbarriere quer zu einer Strömungsrichtung im Ka-

nal zu bilden, während die Seitenelektroden relativ zur Strömungsrichtung vor der Zentralelektrode angeordnet sind und dielektrische Feldbarriere im Wesentlichen parallel zur Strömungsrichtung bilden.

Wenn die Zentralelektrode an ihrem freien Ende eine Verbreiterung, zum Beispiel in Form von abstehenden Elektrodensegmenten oder einer Y- oder T-förmigen Auffächerung aufweist, können sich Vorteile für die Zuverlässigkeit der Partikelhalterung gegen die Strömungskräfte ergeben. Wenn die Hexoden-Elektrodenanordnung mit einer Gegenelektrode auf Massepotential ausgestattet ist, die relativ zur Strömungsrichtung mittig vor den Seitenelektroden angeordnet ist, kann vorteilhafterweise ein geschlossener Feldkäfig gebildet werden. Insbesondere bei einer Ansteuerung der Elektroden mit einer 60° -Phasenverschiebung kann der durch die Hexoden-Elektrodenanordnung gebildete Käfig dielektrisch symmetrisch geschlossen werden.

Die Elektrodenanordnung mit mindestens einem Paar gerader Elektrodenstreifen, die an den Boden- und Deckflächen des Kanals angeordnet sind und sich quer zur Längsrichtung des Kanals erstrecken, stellt einen weiteren unabhängigen Gegenstand der Erfindung dar. Diese Elektrodenanordnung ermöglicht vorteilhafterweise die Halterung gerader Partikelreihen, innerhalb derer die einzelnen Partikel noch identifizierbar und insbesondere messbar sind.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Figuren 1 bis 5: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Mikrosysteme (Ausschnitte), die zur Umsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingerichtet sind,

Figur 6: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Hexoden-Elektrodenanordnungen,

Figur 7: Illustrationen von Potentialverläufen, die mit erfindungsgemäßen Hexoden-Elektrodenanordnungen erzeugt werden,

Figuren 8, 9: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Halteeinrichtungen mit Streifenelektroden, und

Figuren 10, 11: Illustrationen herkömmlicher Mikrosysteme.

Die Erfindung wird mit einem fluidischen Mikrosystem realisiert, dessen Aufbau, Betriebsweise und Zusatzeinrichtungen an sich bekannt sind und daher hier nicht gesondert beschrieben werden. In der folgenden Erläuterung wird lediglich auf einen Ausschnitt eines Mikrosystems mit einem Hauptkanal, mindestens einer Mündung eines Seitenkanals und mindestens einer stromabwärts von der Mündung angeordneten Halteeinrichtung Bezug genommen. In einem erfindungsgemäßen Mikrosystem können mehrere derartige Kombinationen angeordnet sein. Die Erfindung wird im Folgenden beispielhaft unter Bezug auf die Positionierung von Partikeln in der Halteeinrichtung mit dielektrischen Kräften erläutert. Die Umsetzung der Erfindung ist nicht auf diese Art der Halterung beschränkt. Halteeinrichtungen, die auf anderen Feldwirkungen beruhen, wie z. B. Laser-Pinzetten oder Ultraschall-Halterungen mit mindestens einem Fokus können analog verwendet werden.

Figur 1 zeigt einen Ausschnitt eines Mikrosystems 100, das einen Hauptkanal 30 und einen Seitenkanal 31 enthält, der an der Mündung 32 in den Hauptkanal 30 übergeht. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist eine T-förmige Kanalankopplung vorgesehen. Durch den Hauptkanal 30 strömt in Richtung des Pfeils A eine

Trägerflüssigkeit 40, in der Partikel 10 suspendiert sind. Die Partikel 10 können beispielsweise ein Partikelgemisch aus verschiedenen Partikelarten 11, 12 umfassen. Durch den Seitenkanal 31 strömt in Richtung des Pfeils B eine Reaktionsflüssigkeit 20, mit der mindestens ein Partikel 13 behandelt werden soll.

Stromabwärts, also relativ zur Strömungsrichtung nach der Mündung 32 ist die Halteeinrichtung 50 vorgesehen, mit der der mindestens eine Partikel zur Behandlung mit der Reaktionsflüssigkeit mindestens zeitweilig festgehalten werden soll. Beim dargestellten Beispiel umfasst die Halteeinrichtung 50 acht Elektroden in Oktopol-Elektrodenanordnung (aus Übersichtlichkeitsgründen sind nur vier Elektroden 51 an der Boden- oder Deckfläche des Hauptkanals 30 gezeigt). Die Elektroden der Halteeinrichtung 50 werden in an sich bekannter Weise so angesteuert, dass ein allseitig geschlossener Feldkäfig 55 mit einem Potentialminimum zum Beispiel in der Mitte der Halteeinrichtung 50 gebildet wird. Das Bezugszeichen 80 bezieht sich auf eine Messeinrichtung zur Erfassung einer Eigenschaft des Partikels in der Halteeinrichtung 50.

Stromaufwärts, also relativ zur Strömungsrichtung vor der Mündung 32 ist eine Aufreihereinrichtung 60 mit einem dielektrophoretisch wirkenden Aufreihelament 61 und einem nachgeordneten dielektrophoretischen Deflektorelement 63 vorgesehen. Es ist nicht zwingend erforderlich, dass die Aufreihereinrichtung 60 in Strömungsrichtung vor der Mündung 32 angeordnet ist. Für eine sichere Beladung der Halteeinrichtung 50 mit den Partikeln 10 oder ausgewählten Partikeln ist die Aufreihereinrichtung jedoch von Vorteil.

Der Hauptkanal 30 hat beispielsweise Dimensionen von 400 μm 40 μm (Breite/Höhe). Die Partikel umfassen beispielsweise biologische Zellen, Zellbestandteile, biologische Makromoleküle oder synthetische Partikel. Die Trägerflüssigkeit 40 ist bei-

spielsweise eine physiologische Salzlösung. Die Reaktionsflüssigkeit 20 umfasst beispielsweise eine physiologische Salzlösung. Alternativ umfasst die Reaktionsflüssigkeit beispielsweise eine Waschlösung oder eine Lösung anderer Stoffzusammensetzungen, insbesondere wässrige Lösungen, wie z. B. mit Agenzien, die eine Reaktion in biologischen Zellen auslösen, Substanzen, die auf ihr Potential zur Hemmung oder Verstärkung eines zellulären Signals überprüft werden sollen (z.B. Membranpotential, Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen, Rezeptoraktivierung), Liganden, die an einen Plasmamembran-Rezeptor binden können, fluorogene Substanzen, die in Zellen eine fluoreszierende Substanz bilden und/oder Substanzen, die auf die Beeinflussung der Vitalität einer Zelle oder Auslösung der Apoptose untersucht werden sollen.

Typische Durchflussmengen der Träger- und Reaktionsflüssigkeiten betragen beispielsweise 0.3 bis 3 nl/s. Der Abstand der Halteeinrichtung 50 von der Mündung 32, insbesondere der Abstand des Potentialminimums der Halteeinrichtung 50 von der Mündung wird vorzugsweise im Bereich von 50 μ m bis 2 mm gewählt. Allgemein ist der Abstand vorzugsweise mindestens gleich der Breite des Hauptkanals 30.

Zur Umsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Partikel 10 mit der Trägerflüssigkeit 40 in Strömungsrichtung (A) entsprechend der Längsrichtung des Hauptkanals 30 bewegt. An der Aufreiheneinrichtung 60 erfolgt unter der Wirkung der trichterförmigen Feldbarriere des Aufreihenelements 61 eine Aufreihung der Partikel 10, wie es an sich aus der fluidischen Mikrosystemtechnik bekannt ist. Die Partikel treffen anschließend auf das Deflektorelement 63, wobei die eine Partikelart 11 (offene Kreise) vom Deflektorelement seitlich abgelenkt wird, während die andere Partikelart 12 (gefüllte Kreise) ohne Ablenkung weiterbewegt wird. Die abgelenkten Partikel werden an der Halteeinrichtung 50 vorbeigeführt, während die gewünschten, nichtab-

gelenkten Partikel von der Halteeinrichtung 50 aufgefangen werden können (z. B. Partikel 13).

Wenn die Positionierung des Partikels 13 in der Halteeinrichtung 50 z. B. mit optischen Mitteln oder durch eine elektrische Impedanzmessung erfasst worden ist, wird durch den Seitenkanal 31 die Reaktionsflüssigkeit 20 zugeführt. Die Zuführung der Reaktionsflüssigkeit 20 erfolgt durch Betätigung einer Pumpeinrichtung (nicht dargestellt). Durch die anströmende Trägerflüssigkeit 40 wird die Reaktionsflüssigkeit 20 in den Hauptkanal 30 umgelenkt. Mit einer Strömungsrichtung parallel zur Strömungsrichtung A der Trägerflüssigkeit, also in Längsrichtung des Hauptkanals 30 strömt die Reaktionsflüssigkeit durch die Halteeinrichtung 50. Da der Abstand der Halteeinrichtung 50 von der Mündung 32 und die Durchflussrate der Träger- und Reaktionsflüssigkeiten bekannt sind, kann der Beginn der Flüssigkeitsbehandlung des Partikels 13 relativ zur Betätigung der Pumpeinrichtung genau festgestellt werden. Die Reaktion des Partikels 13 auf die Reaktionsflüssigkeit 20 kann beispielsweise durch eine Fluoreszenzmessung mit einem auf die Halteeinrichtung 50 gerichteten Mikroskop beobachtet werden. Mit der Fluoreszenzmessung am gehaltenen Partikel 13 wird zum Beispiel die Beladungskinetik des Fluoreszenzfarbstoffs in den Partikel 13 erfasst.

Figur 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel, bei dem Partikel 10 aus zwei Teilkanälen 33, 34 in den Hauptkanal 30 zusammenfließen, in den an der Mündung 32 der Seitenkanal 31 mit der Reaktionsflüssigkeit 20 mündet. Die Aufreihereinrichtung 60 umfasst in diesem Fall zwei Aufreihenelemente 61, 62 und zwei Deflektorelemente 63, 64. Die Reaktionsflüssigkeit 20 bildet einen Beladungsstrom parallel zur Strömungsrichtung der Trägerflüssigkeit 40. Da die Strömungen im Mikrosystem wirbelfrei und laminar gebildet sind, ist der Beladungsstrom der Reaktionsflüssigkeit 20 vorteilhafterweise von der Trägerflüssigkeit 40 abgegrenzt. Die

Grenze ist beispielhaft mit einer gepunkteten Linie eingezeichnet.

Bei dem Ausführungsbeispiel gemäß Figur 2 ist vorgesehen, dass verschiedene Partikelarten 11, 12 durch die Teilkanäle 33, 34 in den Hauptkanal 30 strömen, wobei durch geeignete Ansteuerung der Aufreiheneinrichtung 60 jeweils ein Partikel 13, 14 von jeder Partikelart im Feldkäfig der Halteeinrichtung 50 gefangen wird. Sobald die gemeinsame Positionierung beider Partikel im Feldkäfig detektiert wird, kann eine Reaktion zwischen den Partikeln und die Abhängigkeit der Reaktion von der zugeführten Reaktionsflüssigkeit beobachtet werden. Es können auch Reaktionen zwischen gleichartigen Partikeln beobachtet werden.

Das in Figur 3 gezeigte Ausführungsbeispiel der Erfindung illustriert das Prinzip einer erfindungsgemäßen Vergleichsmessung. Im Hauptkanal 30 sind als Aufreiheneinrichtung 60 zwei Aufreihenelemente 61, 62 vorgesehen. Die in der Trägerflüssigkeit 40 suspendiert anströmenden Partikel 10 werden mit den Aufreihenelementen 61, 62 auf zwei getrennte Strömungsbahnen fokussiert, die jeweils auf die Halteeinrichtung 50 und eine Referenz-Halteeinrichtung 70 gerichtet sind. Zwischen den Aufreihenelementen 61, 62 und den Halteeinrichtungen 50, 70 sind zwei Deflektorelemente 63, 64 angeordnet, mit denen nach Beladung der Halteeinrichtungen 50, 70 weitere anströmende Partikel auf einen mittleren Strömungspfad gelenkt und zwischen den Halteeinrichtungen 50, 70 hindurchgeführt werden können. Das Bezugszeichen 90 bezieht sich auf eine Referenz-Messeinrichtung zur Erfassung einer Eigenschaft des Referenz-Partikels in der Referenz-Halteeinrichtung 70.

Wenn beide Halteeinrichtungen 50, 70 jeweils mit einem Partikel 13, 15 beladen sind, wird die Reaktionsflüssigkeit 20 durch den Seitenkanal 31 zugeführt. Durch die Abgrenzung zwischen dem Beladungsstrom der Reaktionsflüssigkeit 20 und der Trägerflüssig-

keit 40 (gepunktete Linie 41) wird lediglich der Partikel 13 in der Halteeinrichtung 50 von der Reaktionsflüssigkeit umspült, während der als Referenzpartikel verwendete Partikel 15 in der Referenz-Halteeinrichtung 70 ausschließlich in der Trägerflüssigkeit 40 suspendiert bleibt.

Die Vergleichsmessung umfasst beispielsweise eine optische oder elektrische Messung an jedem der Partikel 13, 15 und eine Korrelation beider Messwerte, z. B. durch eine Differenzbildung. Diese Ausführungsform der Erfindung ermöglicht vorteilhafterweise einen direkten Vergleich der Messergebnisse vom Partikel 13 mit den Messergebnissen vom unbeeinflussten Partikel 15.

Figur 3 illustriert ein wichtiges Merkmal der Erfindung, das unabhängig von der Bereitstellung der Referenz-Halteeinrichtung 70, also auch beispielsweise bei dem Ausführungsbeispiel gemäß Figur 1 realisiert sein kann. Allgemein ist die Halteeinrichtung 50 so gebildet, dass die mindestens zeitweilige Positionierung des zu behandelnden Partikels stromabwärts von der Mündung 32 in der Seite des Hauptkanals 30 erfolgt, in die der Seitenkanal mündet. Das Potentialminimum der Halteeinrichtung 50, z. B. des dielektrischen Feldkäfigs, ist außerhalb der Mitte des Hauptkanals 30 hin zur Seitenwand 35 verschoben angeordnet, in der auch die Mündung 32 des Seitenkanals 31 gebildet ist. Die Verschiebung der Halteeinrichtung oder wenigstens des Potentialminimums hin zum Kanalrand besitzt den Vorteil, dass selbst bei schwankenden Durchflussmengen der Reaktions- und Trägerflüssigkeiten der Partikel in der Halteeinrichtung 50 von der Reaktionsflüssigkeit umspült wird. Vorteilhafterweise wird der Beladungsstrom der Reaktionsflüssigkeit 30 homogen und kontinuierlich gebildet. Dies ermöglicht eine erhöhte Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der am behandelten Partikel erhaltenen Messergebnisse. Ein weiterer Vorteil der zur Seitenwand 35 in verschobener Positionierung des Partikel besteht darin, dass vom Seitenkanal 31 eine relativ schwache Strömung der Reak-

tionsflüssigkeit gebildet werden kann. Wenn die Halteeinrichtung 50 den Partikel in der Kanalmitte positioniert, muss die Reaktionsflüssigkeit gegebenenfalls mit einer erhöhten Durchflussmenge eingeführt werden.

Erfindungsgemäß können mehrere Seitenkanäle 31, 36 in den Hauptkanal 30 münden, wie beispielhaft in den Figuren 4 und 5 illustriert ist. Die Seitenkanäle 31, 36 können eine Kreuzung bilden, an der über einander gegenüberliegende Mündungen 32, 37 gleichzeitig oder aufeinanderfolgend eine oder mehrere Reaktionsflüssigkeiten in den Hauptkanal gespült werden. Alternativ kann vorgesehen sein, dass die Seitenkanäle relativ zur Strömungsrichtung A im Hauptkanal 30 versetzt angeordnet sind. Die Mündungen 32, 37 können in diesem Fall auf der gleichen Seite des Hauptkanals 30 gebildet sein. Allgemein kann der Winkel zwischen einem Seitenkanal und dem Hauptkanal je nach den konkreten Anforderungen und baulichen Bedingungen im Mikrosystem gewählt werden.

Das Ausführungsbeispiel gemäß Figur 4 zeigt einen Hauptkanal 30 mit einer Aufreiheneinrichtung 60 (siehe Figur 1) und einer stromabwärts von den Mündungen 32, 37 angeordneten Halteeinrichtung 50. In diesem Fall ist das Potentialminimum der Halteeinrichtung 50 vorzugsweise in der Mitte des Hauptkanals 30 angeordnet, damit ein gleichförmiger Einfluss der Reaktionsflüssigkeiten aus den Seitenkanälen 31, 36 sichergestellt wird.

Figur 4 illustriert die Zufuhr der Reaktionsflüssigkeit 20 als segmentierte Flüssigkeitssäule, bei der sich Aktivsegmente 21 der Reaktionsflüssigkeit 20 mit Passivsegmenten 22 einer Barrierenflüssigkeit abwechseln.

Die Aktivsegmente 21 enthalten die mindestens eine gewünschte Reaktionsflüssigkeit, z. B. auf der Basis einer wässrigen Lösung. Sie sind voneinander durch die Passivsegmente 22 ge-

trennt. Die Barrierenflüssigkeit in den Passivsegmenten 22 umfasst beispielsweise Öl, das sich als Difussionsbarriere über den gesamten Querschnitt des Seitenkanals 31 erstreckt. Die Zuführung der Reaktionsflüssigkeit in Form einer segmentierten Flüssigkeitssäule besitzt den Vorteil, dass die Beladung des Partikels in der Halteeinrichtung 50 entsprechend einem bestimmten Zeitschema mit einer oder mehreren verschiedenen Reaktionsflüssigkeiten erfolgen kann. Wenn mehrere Reaktionsflüssigkeiten in der Flüssigkeitssäule angeordnet sind, kann die Behandlung des mindestens einen Partikels in der Halteeinrichtung nach einem bestimmten Verfahrensprotokoll mit verschiedenen Substanzen erfolgen. Des Weiteren wird, solange sich ein Passivsegment 22 an der Mündung 32 befindet, eine unbeabsichtigte Diffusion einer Reaktionsflüssigkeit in die Trägerflüssigkeit 41 vermieden. Mit den Diffusionsbarrieren wird vorteilhafterweise der Zeitpunkt definiert festgelegt, zu dem die jeweilige Reaktionsflüssigkeit des auf ein bestimmtes Passivsegment 22 folgenden Aktivsegments 21 den Partikel 13 erreicht.

Figur 5 illustriert schematisch die gleichzeitige Beladung des Partikels 13 in der Halteeinrichtung 50 mit zwei verschiedenen Reagenzien. Vorteilhafterweise können die Durchflussmengen entsprechend den Strömungsrichtungen B in den Seitenkanälen 31, 36 so eingestellt werden, dass sich die verschiedenen Reaktionsflüssigkeiten erst am Ort des Partikels 13 treffen und erst dort beispielsweise chemisch miteinander reagieren können. Der Zusammenfluss kann auch weiter stromabwärts vorgesehen sein. Alternativ kann vorgesehen sein, dass die verschiedenen Reaktionsflüssigkeiten bereits stromaufwärts, also in Bezug auf die Strömungsrichtung A der Trägerflüssigkeit vor der Halteeinrichtung 50 miteinander vermengt werden und entsprechend beispielsweise miteinander chemisch reagieren.

Die Figuren 6 und 7 illustrieren den Aufbau und die Funktion einer zur Umsetzung der Erfindung bevorzugt verwendeten Halte-

einrichtung 52. Die Halteeinrichtung 52 umfasst sechs Elektroden, von denen drei Elektroden jeweils auf den Boden- und Deckflächen des Hauptkanals angeordnet sind. Aus Übersichtlichkeitsgründen sind in Figur 6 jeweils nur drei Elektroden 53, 54 und 55 z. B. der Bodenfläche ohne die zugehörigen Verbindungen mit einer Spannungsquelle gezeigt (Elektrodentripel). Da die Halteeinrichtung 52 die drei Elektroden paarweise, also sechs Elektroden umfasst, wird sie auch als Hexoden-Elektrodenanordnung bezeichnet.

Die Hexoden-Elektrodenanordnung, die einen unabhängigen Gegenstand der Erfindung darstellt, zeichnet sich dadurch aus, dass die Elektroden von jedem Elektrodentripel eine Zentralelektrode 53 und zwei Seitenelektroden 54, 55 umfassen, deren freie Enden mit Abstand voneinander angeordnet sind und die bei Beaufschlagung mit einer hochfrequenten Wechselspannung einen geschlossenen oder gegebenenfalls entgegen der Strömungsrichtung A offenen Feldkäfig (Potentialtopf) bilden. Die Elektroden besitzen beispielsweise jeweils eine Streifenform. Die Breite der Elektrodenstreifen beträgt vorzugsweise 2 μm bis 30 μm . Allgemein können die Elektroden verschiedene Formen besitzen, z.B. stab- oder streifenförmig sein und eine entgegengesetzt zur Strömungseinrichtung weisende y-förmige Auffächerung aufweisen.

Die Zentralelektrode 53 ist relativ zur Strömungsrichtung mittig nach Seitenelektroden 54, 55 angeordnet, die seitlich in den Hauptkanal ragen. Ein einströmender Partikel wird in der Halteeinrichtung 52 durch die Zusammenwirkung der mechanischen Strömungskräfte der Träger- und/oder Reaktionsflüssigkeit und der dielektrischen Kräfte im Potentialminimum der Hexoden-Elektrodenanordnung positioniert.

Besondere Vorteile der Hexoden-Elektrodenanordnungen 52 bestehen darin, dass durch die Zentralelektrode 53 eine besonders wirksame Feldbarriere entgegen der Strömungsrichtung A (in Kä-

figauslaufrichtung) erzeugt wird. Die Haltekraft ist im Vergleich zu den Oktopol-Elektrodenanordnungen (siehe z. B. Figur 1) erhöht. Es wird ein schnelles und sicheres Beladen der Halteeinrichtung 52 mit Mikroobjekten ermöglicht. Dies ist besonders für kinetische Messungen an Zellen oder Zellbestandteilen (Zellorganellen) vorteilhaft, da nur wenige Moleküle zur Auslösung von Signalkaskaden ausreichen und bei zu langsamer Beladung Diffusionsprozesse dominieren könnten. Ein weiterer Vorteil der Hexoden-Elektrodenanordnungen besteht in der variablen Ansteuerung der Elektroden.

Die Teilbilder A, B und C von Figur 6 zeigen verschiedene Varianten von Hexoden-Elektrodenanordnungen. Die verschiedenen Ausführungsbeispiele unterscheiden sich in Bezug auf die Abstände der freien Elektrodenenden a , b und c und die Winkel zwischen den geraden Elektrodenstreifen α , β und γ . Gemäß Teilbild A ist vorgesehen, dass α , $\gamma \geq 90^\circ$ und $\beta \leq 180^\circ$ betragen. Es kann insbesondere $\alpha = \beta = \gamma = 120^\circ$ vorgesehen sein. Die Abstände a , b und c sind beispielsweise gleich der Höhe des Hauptkanals gewählt (z. B. $40 \mu\text{m}$). Bei 60° -Phasenansteuerung ist der durch die elektronische Struktur gemäß Fig. 6 gebildete Feldkäfig immer geschlossen. Teilbild B von Figur 6 zeigt ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel mit $\alpha (= \gamma) = 90^\circ$. Bei dieser Variante ist der Feldkäfig entgegen der Strömungsrichtung offen.

Das Teilbild C illustriert weitere Varianten, die gemeinsam oder einzeln zur Optimierung der Hexoden-Elektrodenanordnung vorgesehen sein können. So ist die Zentralelektrode 53 an ihrem freien Ende durch abstehende Elektrodensegmente verbreitert. Des Weiteren ist zusätzlich eine sogenannte „floatende“ oder sich auf Masse befindliche Gegenelektrode (Elektrodenpaar) 56 vorgesehen. Durch diese Gestaltung kann einerseits die Halteeffektivität der Hexoden-Elektrodenanordnung verbessert und andererseits der Feldkäfig entgegengesetzt zur Strömungsrichtung A geschlossen werden. Dadurch bleiben Partikel in der Halteein-

richtung 52, selbst wenn zeitweilig die Strömungsbewegung der Trägerflüssigkeit abgeschaltet wird.

Die folgende Tabelle illustriert verschiedene Schemata zur Ansteuerung der Hexoden-Elektrodenanordnung.

	1. Elektroden- ebene			2. Elektroden- ebene		
Elektrode	54	55	53	54	55	53
3 Phasen- Ansteuerung	0	$(2/3)\pi$	$(4/3)$	$(4/3)$	0	$(2/3)$
4 Phasen- Ansteuerung	0	$\pi/2$	$- /2$	π	$- /2$	$\pi/2$
6 Phasen- Ansteuerung	0	$(2/3)$	$(4/3)$	π	$(5/3)$	$\pi/3$

Figur 7 illustriert die Potentialverteilung in den Hexoden-Elektrodenanordnung mit 6-Phasen-ansteuerung (siehe Tabelle), wobei jeweils die mittlere quadratische elektrische Feldstärke (Potential der dielektrischen Feldstärke) als Kontur in ausgewählten Ebenen über verschiedene Hexoden-Elektrodenanordnungen gezeigt sind. Im Einzelnen zeigen die Teilbilder:

- A) Potential in zentraler horizontaler Ebene (xy, parallel zur Bodenfläche) zwischen den Elektroden (schwarz) für einen Käfig des Typs aus Fig. 6A mit $(\alpha=\beta=\gamma=120^\circ)$,
- B) Potential in zentraler vertikaler Ebene (yz) zwischen den Elektroden für einen Käfig des Typs aus Fig. 6A mit $(\alpha=\beta=120^\circ)$, Skalierung in vertikaler und horizontaler Richtung ist nicht identisch),
- C) Potential in zentraler horizontaler Ebene für einen Käfig des Typs aus Fig. 6B $(\alpha=90^\circ, \beta=180^\circ)$ mit symmetrischem Aufbau (Elektroden spitzen liegen auf Kreis),
- D) Potential in zentraler horizontaler Ebene für einen Käfig des Typs aus Fig. 6C $(\alpha=90^\circ, \beta=180^\circ)$ mit symmetrischem Aufbau und floatenden Zusatzelektroden (grau),

- E) Potential in zentraler horizontaler Ebene für einen Käfig des Typs aus Fig. 6B ($\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=180^\circ$) mit symmetrischem Aufbau, und
- F) Potential in zentraler horizontaler Ebene für einen Käfig des Typs aus Fig. 6B ($\alpha=90^\circ$, $\beta=180^\circ$) mit asymmetrischem Aufbau und verstärktem Ausgangselektrodenpaar.

Die Potentialverteilungen illustrieren die Bildung des lokalen Potentialminimums mit einem starken Feldgradienten insbesondere in Strömungsrichtung an der Zentralelektrode 54.

Gemäß einem weiteren unabhängigen Gesichtspunkt der Erfindung kann die Halteeinrichtung 57 durch mindestens ein Paar gerader Elektrodenstreifen 58 gebildet werden, die sich quer über die Breite des Hauptkanals 30 erstrecken und jeweils an den Boden- und Deckflächen angeordnet sind. Diese Gestaltung ist schematisch in den Figuren 8 und 9 illustriert. Ein Paar gerader Elektrodenstreifen bildet eine lineare, quer verlaufende Feldbarriere, die vorteilhafterweise eine zuverlässige Halterung auch bei einer erhöhten Ladeströmung der Reaktionsflüssigkeit sicherstellt. Vorteilhafterweise ordnen sich an dieser Feldbarriere Partikel 10 reihenweise nebeneinander an. Die Aggregatbildung, die an herkömmlichen Parkelektroden auftritt (siehe Figur 11), wird in diesem Fall vermieden. Die Halteeinrichtung 57 besitzt ferner den Vorteil, dass die optische Zugänglichkeit und die individuelle Beobachtbarkeit der Partikel erhalten bleibt. Die Breite der Elektrodenstreifen und der Abstand sind vorzugsweise im Bereich von 2 μm bis 50 μm gewählt.

Figur 9 zeigt eine Schnittdarstellung des Hauptkanals 30 in Strömungsrichtung A mit überhöht eingezeichneten Elektrodenstreifen. An den Elektroden 58 ist jeweils eine Polarität entsprechend einer aktuellen Feldrichtung angegeben. Die Elektroden 58 können entsprechend dem oberen Teilbild von Figur 9 einander gegenüberliegend oder entsprechend dem unteren Teilbild

von Figur 9 relativ zueinander versetzt an den oberen und unteren Kanalseiten angeordnet sein. Der Versatz der Elektroden 58 zueinander führt zu einem Versatz der aufgereihten Partikel auf der unteren und oberen Kanalseite. Bei mikroskopischer Abbildung erscheinen infolge des versetzten optischen Fokus die am Boden befindlichen Partikel optisch dunkel und die Objekte auf der oberen Kanalebene heller.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Behandlung mindestens eines Partikels (10 - 14) mit mindestens einer Reaktionsflüssigkeit (20, 21) in einem Hauptkanal (30) eines fluidischen Mikrosystems (100), mit den Schritten:

- Bewegung des mindestens einen Partikels (10 - 14) mit einer Trägerflüssigkeit (40), die in einer Längsrichtung des Hauptkanals (30) strömt, bis zu einer Halteeinrichtung (50, 52, 57),
- mindestens zeitweise Halterung des mindestens einen Partikels (10 - 14) unter der Wirkung einer Haltekraft, die von der Halteeinrichtung (50, 52, 57) ausgeübt wird, und
- Zuführung der Reaktionsflüssigkeit (20, 21) von mindestens einem Seitenkanal (31, 36) in den Hauptkanal (30), so dass das mindestens eine gehaltete Partikel (10 - 14) von der Reaktionsflüssigkeit (20, 21) umspült wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Halteeinrichtung (50, 52, 57) stromabwärts nach einer Mündung (32, 37) des Seitenkanals (31, 36) in den Hauptkanal (30) angeordnet ist und die Reaktionsflüssigkeit (20, 21) mit einer Strömungsrichtung, die in die Längsrichtung des Hauptkanals (30) weist, durch die Halteeinrichtung (50, 52, 57) strömt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der mindestens eine Partikel (10 - 14) in der Halteeinrichtung (50, 52, 57) an einem lokalen Potentialminimum oder entlang einer Potentiallinie gehalten wird, die sich senkrecht zur Längsrichtung des Hauptkanals (30) erstreckt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem der mindestens eine Partikel (10 - 14) mit der Halteeinrichtung (50, 52, 57) auf einer Seite des Hauptkanals (30) gehalten ist, die von der Kanalwand begrenzt wird, in der die Mündung des Seitenkanals (31, 36) gebildet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem der mindestens eine Partikel mit der Halteeinrichtung (50, 52, 57) in der Mitte des Hauptkanals gehalten wird.

5. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der mindestens eine Partikel mit der Halteeinrichtung mit dielektrophoretischen, optischen und/oder schallvermittelten Haltekräften gehalten wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem der mindestens eine Partikel mit der Halteeinrichtung (50, 52, 57) mit einer Kombination aus dielektrophoretischen, optischen und/oder schallvermittelten Haltekräften und Strömungskräften gehalten wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem mit der Halteeinrichtung (50, 52) eine Feldbarriere erzeugt wird, die sich in der Längsrichtung des Hauptkanals bis zum lokalen Potentialminimum verengt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem mit der Halteeinrichtung (57) mindestens eine Feldbarriere erzeugt wird, die sich linear quer zur Längsrichtung des Hauptkanals erstreckt.

9. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem mindestens eine Messung am Partikel in der Halteeinrichtung (50, 52, 57) erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem mindestens eine Vergleichsmessung an mindestens einem Referenzpartikel (15) in einer Referenz-Halteeinrichtung (70) erfolgt, wobei der Referenzpartikel (15) in der Referenz-Halteeinrichtung (70) ausschließlich der Trägerflüssigkeit (40) ohne die Reaktionsflüssigkeit oder einer anderen Reaktionsflüssigkeit ausgesetzt wird.

11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die mindestens eine Reaktionsflüssigkeit (20) als segmentierte Flüssigkeitssäule eingespült wird, in der sich Aktivsegmente (21) mit der mindestens einen Reaktionsflüssigkeit und Passivsegmente (22) einer Barrierenflüssigkeit abwechseln.

12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der mindestens eine Partikel mit einem Abstand im Bereich von 50 µm bis 4 mm von der Mündung (32, 37) des Seitenkanals (31, 36) positioniert wird.

13. Fluidisches Mikrosystem (100), insbesondere zur Behandlung mindestens eines in einer Trägerflüssigkeit (40) suspendierten Partikels (10 - 14), das umfasst:

- einen Hauptkanal (30), der zur Aufnahme einer Strömung der Trägerflüssigkeit (40) eingerichtet ist und mit dem an mindestens einer Mündung (32, 37) ein Seitenkanal (31, 36) zur Zuführung einer Reaktionsflüssigkeit (20, 21) verbunden ist, und
- eine Halteeinrichtung (50, 52, 57), die zur mindestens zeitweisen Halterung des mindestens einen Partikels (10 - 14) eingerichtet ist,

dadurch gekennzeichnet, dass

- der Hauptkanal (30) zur Aufnahme einer Strömung der Reaktionsflüssigkeit (20, 21) eingerichtet ist, die mit einer Strömungsrichtung, die in die Längsrichtung des Hauptkanals (30) weist, durch die Halteeinrichtung (50, 52, 57) strömt, und

- die Halteeinrichtung (50, 52, 57) stromabwärts nach der Mündung (32, 37) des Seitenkanals (31, 36) angeordnet ist.

14. Mikrosystem nach Anspruch 13, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52, 57) zur Erzeugung mindestens eines lokalen Potentialminimums oder mindestens einer Potentiallinie eingerichtet ist, die sich senkrecht zur Strömungsrichtung der Reaktionsflüssigkeit erstreckt.

15. Mikrosystem nach Anspruch 13 oder 14, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52, 57) auf einer Seite des Hauptkanals (30) angeordnet ist, die von der Kanalwand begrenzt wird, in der die Mündung des Seitenkanals (31, 36) gebildet ist.

16. Mikrosystem nach Anspruch 13 oder 14, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52, 57) in der Mitte des Hauptkanals angeordnet ist.

17. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 16, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52, 57) zur Ausübung von dielektrophoretischen, optischen und/oder schallvermittelten Haltekräften eingerichtet ist.

18. Mikrosystem nach Anspruch 17, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52) zur Bildung einer dielektrischen Feldbarriere eingerichtet ist, die sich in der Längsrichtung des Hauptkanals bis zum lokalen Potentialminimum verengt.

19. Mikrosystem nach Anspruch 18, bei dem die Halteeinrichtung (52) mindestens eine Zentralelektrode (54) umfasst, die auf der stromabwärts gelegenen Seite der Halteeinrichtung (52) mittig angeordnet ist.

20. Mikrosystem nach Anspruch 19, bei dem die Halteeinrichtung (52) mindestens zwei Seitenelektroden (53, 55) aufweist, die

auf der stromaufwärts gelegenen Seite der Zentralelektrode (54) in den Kanal ragen.

21. Mikrosystem nach Anspruch 20, bei dem die Halteeinrichtung (52) mindestens eine Gegenelektrode (56) aufweist, die auf der stromaufwärts gelegenen Seite der Seitenelektroden (53, 55) angeordnet ist.

22. Mikrosystem nach Anspruch 17, bei dem die Halteeinrichtung (57) zur Bildung mindestens einer Feldbarriere eingerichtet ist, die sich linear quer zur Längsrichtung des Hauptkanals erstreckt.

23. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 22, bei dem mindestens eine Messeinrichtung (80) zur Vermessung des Partikel in der Halteeinrichtung (50, 52, 57) vorgesehen ist.

24. Mikrosystem nach Anspruch 23, bei dem mindestens eine Referenz-Messeinrichtung (90) zur Vergleichsmessung an mindestens einem Referenzpartikel in einer Referenz-Halteeinrichtung (70) vorgesehen ist.

25. Mikrosystem nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 24, bei dem die Halteeinrichtung (50, 52, 57) dazu vorgesehen ist, den mindestens einen Partikel mit einem Abstand im Bereich von 50 μm bis 4 mm von der Mündung (32, 37) des Seitenkanals (31, 36) zu positionieren.

26. Elektrodenanordnung (52) zur Halterung suspendierter Partikel in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems, die mindestens drei Paare von Elektroden (53, 54, 55) aufweist, wobei die Elektroden (53, 54, 55) jeweils an Boden- und Deckflächen des Kanals angeordnet sind und jeweils eine Zentralelektrode (53) und zwei Seitenelektroden (54, 55) umfassen, wobei die Zentral-

elektroden (53) dazu eingerichtet sind, bei Beaufschlagung mit einer hochfrequenten Wechselspannung eine dielektrische Feldbarriere quer zu einer Strömungsrichtung (A) im Kanal zu bilden, und die Seitenelektroden (54, 55) relativ zur Strömungsrichtung (A) vor der Zentralelektrode (53) angeordnet sind.

27. Elektrodenanordnung gemäß Anspruch 26, bei der wenigstens eine der Zentralelektroden (53) an ihrem freien Ende eine Verbreiterung aufweist.

28. Elektrodenanordnung gemäß Anspruch 26 oder 27, die mit mindestens einer auf Massepotential oder freiem (floatenden) Potential betriebene Gegenelektrode (56) ausgestattet ist, die relativ zur Strömungsrichtung (A) mittig vor den Seitenelektroden (54, 55) angeordnet ist.

29. Elektrodenanordnung (57) zur Halterung suspendierter Partikel in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems, die mindestens ein Paar gerader Elektrodenstreifen (58) aufweist, die an den Boden- und Deckflächen des Kanals angeordnet sind und sich quer zur Längsrichtung des Kanals erstrecken.

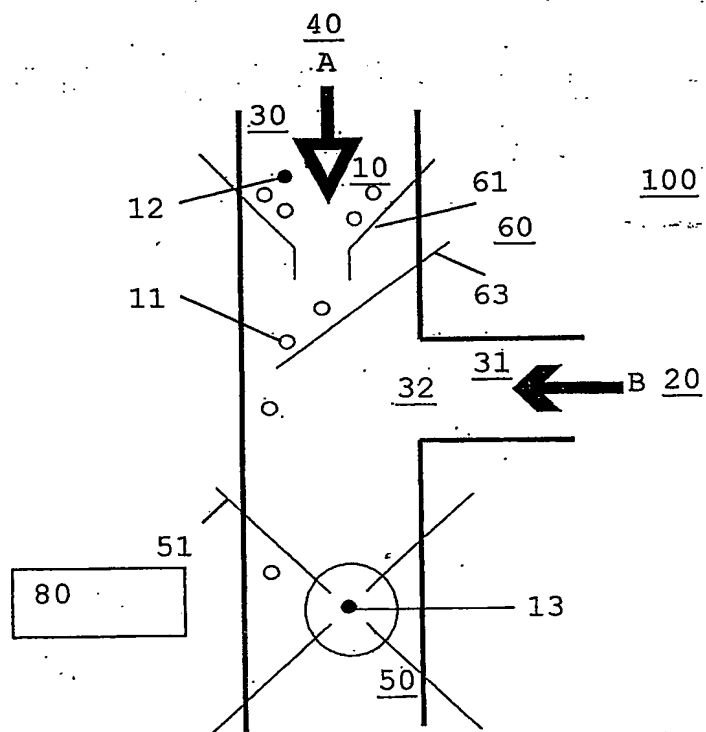
30. Elektrodenanordnung gemäß Anspruch 29, bei der die Elektrodenstreifen (58) an den Boden- und Deckflächen einander gegenüberliegend ausgerichtet sind.

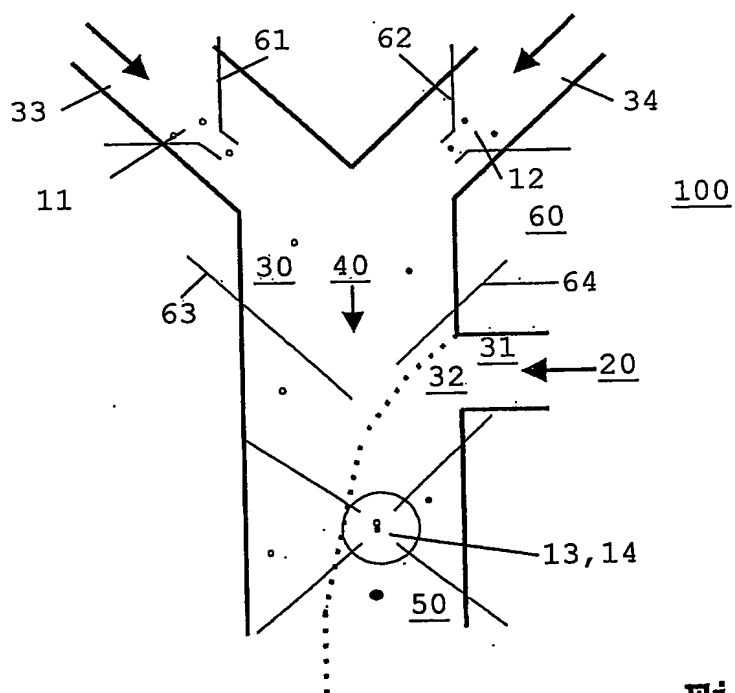
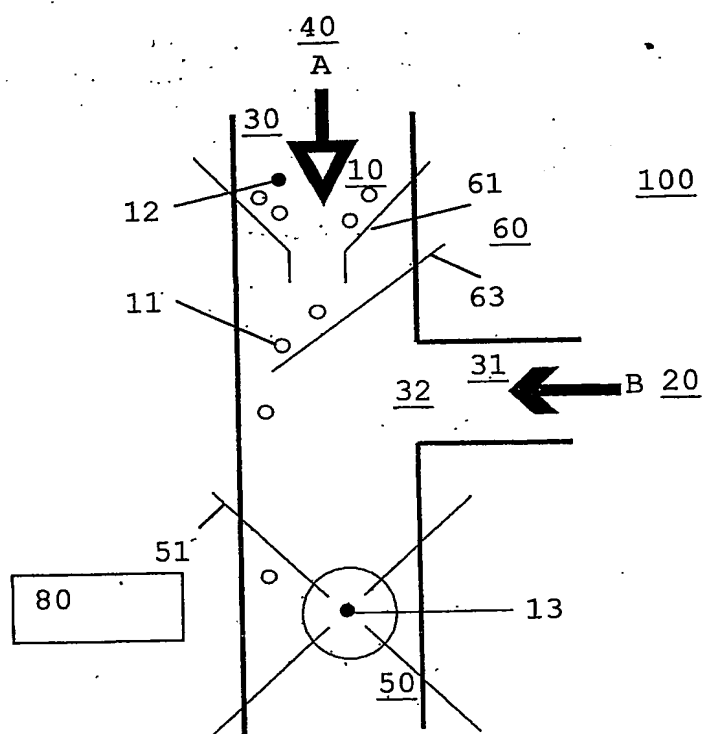
31. Elektrodenanordnung gemäß Anspruch 29, bei der die Elektrodenstreifen (58) an den Boden- und Deckflächen versetzt ausgerichtet sind.

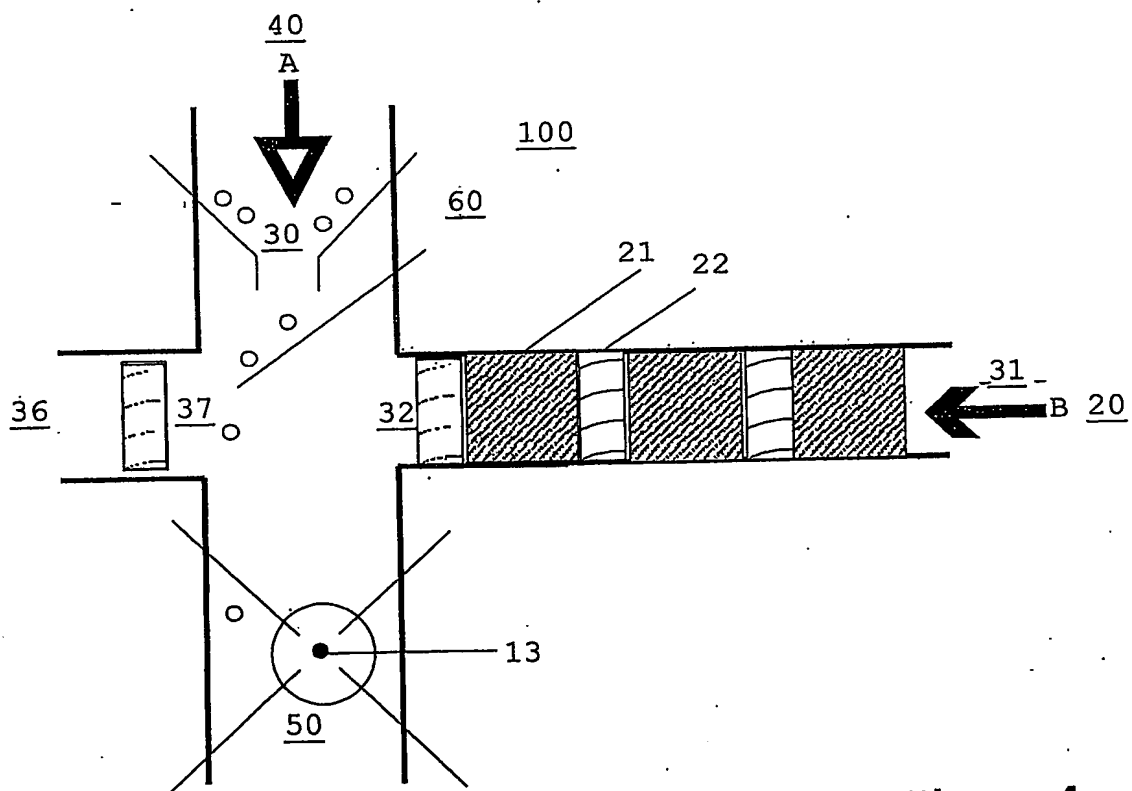
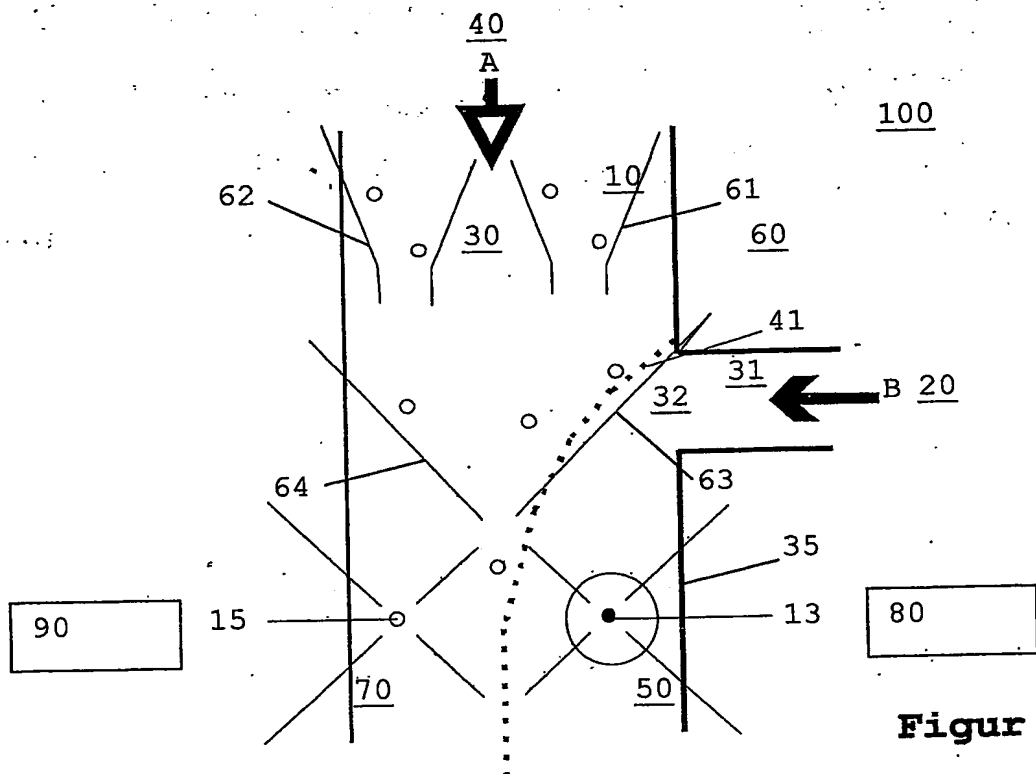
Zusammenfassung

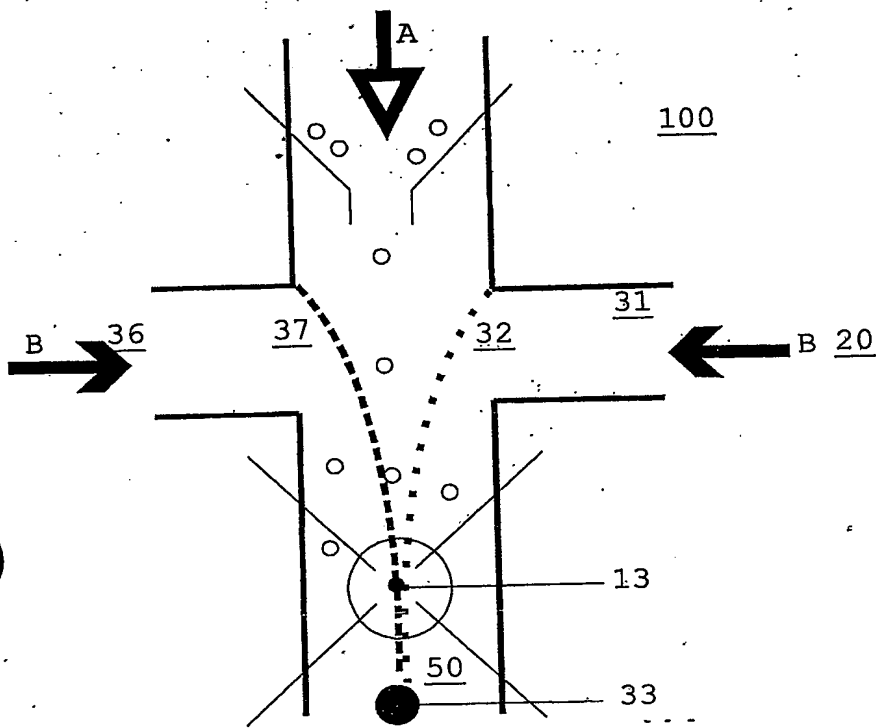
Es werden Verfahren zur Behandlung mindestens eines Partikels (10 - 13) mit mindestens einer Reaktionsflüssigkeit (20) in einem Hauptkanal (30) eines fluidischen Mikrosystems (100) beschrieben, mit den Schritten: Bewegung des mindestens einen Partikels (10 - 13) mit einer Trägerflüssigkeit (40), die in einer Längsrichtung des Hauptkanals (30) strömt, bis zu einer Halteeinrichtung (50), mindestens zeitweise Halterung des mindestens einen Partikels (13) unter der Wirkung einer Haltekraft, die von der Halteeinrichtung (50) ausgeübt wird, und Zuführung der Reaktionsflüssigkeit (20) von mindestens einem Seitenkanal (31) in den Hauptkanal (30), so dass das mindestens eine gehaltete Partikel (13) von der Reaktionsflüssigkeit (20) umspült wird, wobei die Halteeinrichtung (50) stromabwärts nach einer Mündung (32) des Seitenkanals (31) in den Hauptkanal (30) angeordnet ist und die Reaktionsflüssigkeit (20) mit einer Strömungsrichtung, die in die Längsrichtung des Hauptkanals (30) weist, durch die Halteeinrichtung (50) strömt. Es werden auch fluidische Mikrosysteme und Elektrodenanordnungen zur Umsetzung der Verfahren beschrieben.

(Fig. 1)

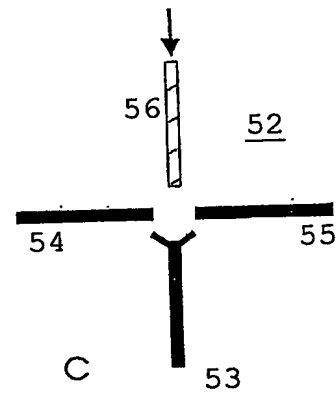
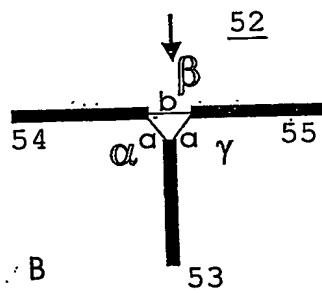
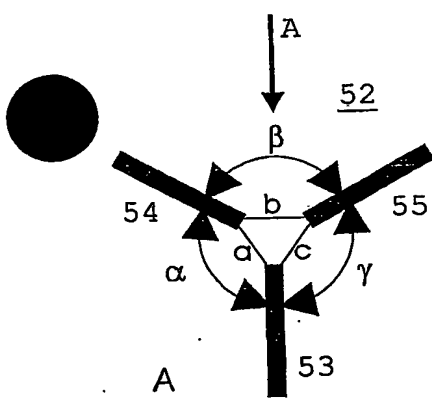




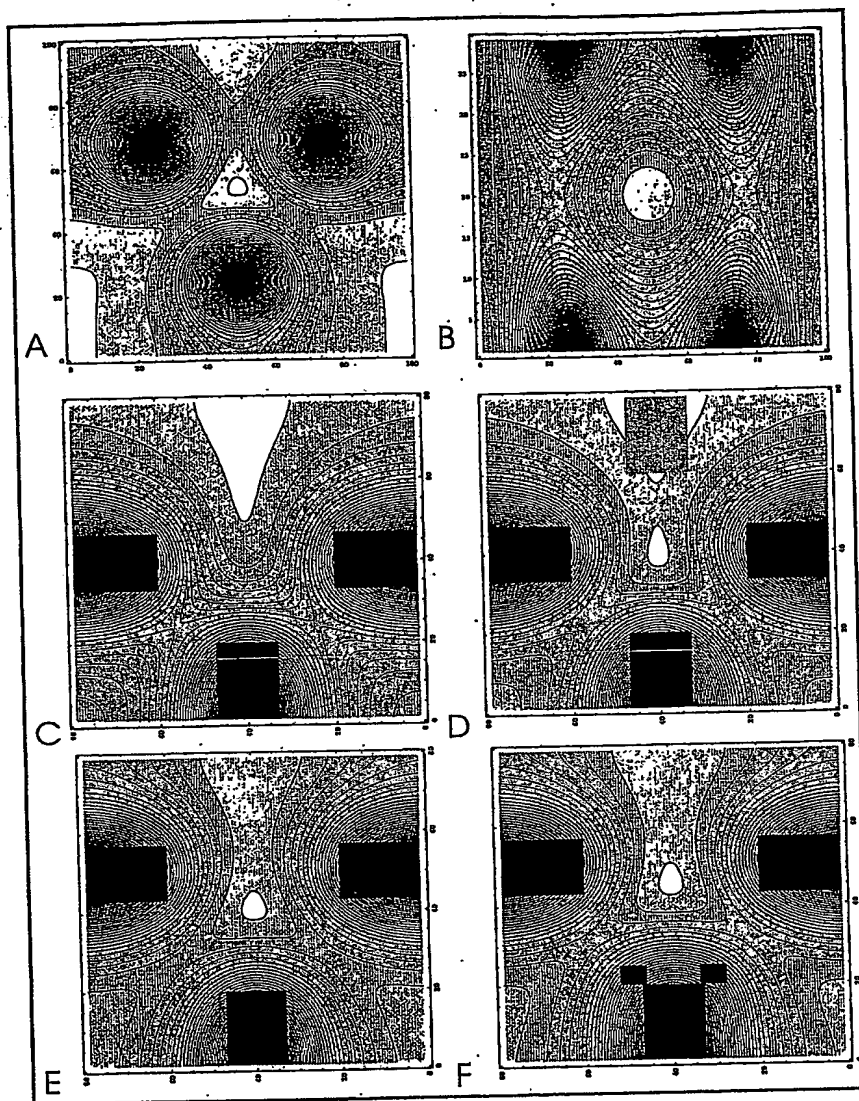




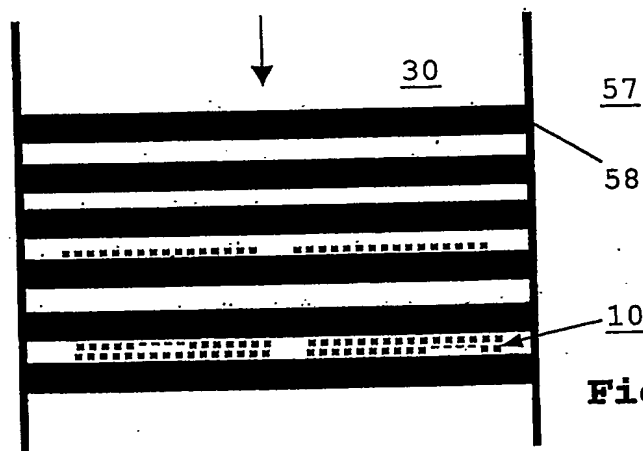
Figur 5



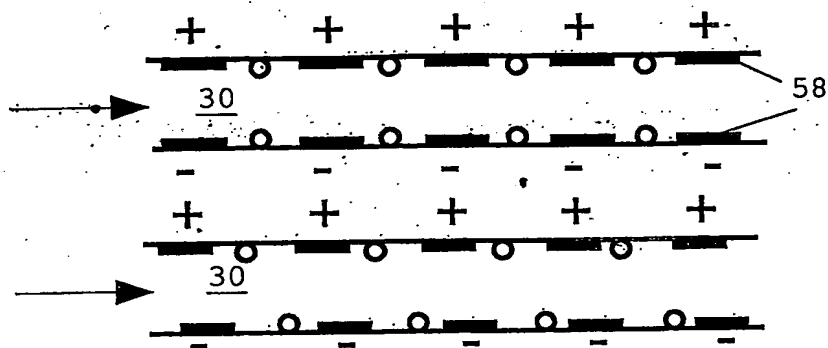
Figur 6



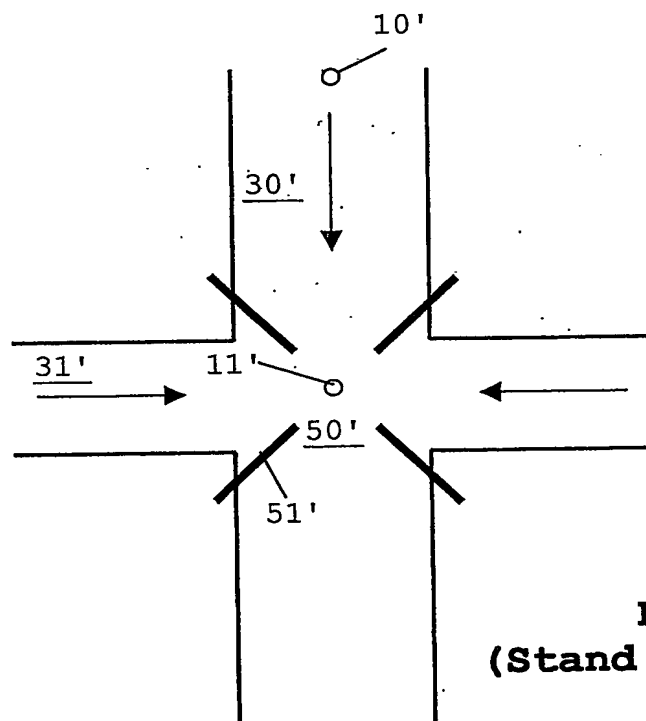
Figur 7



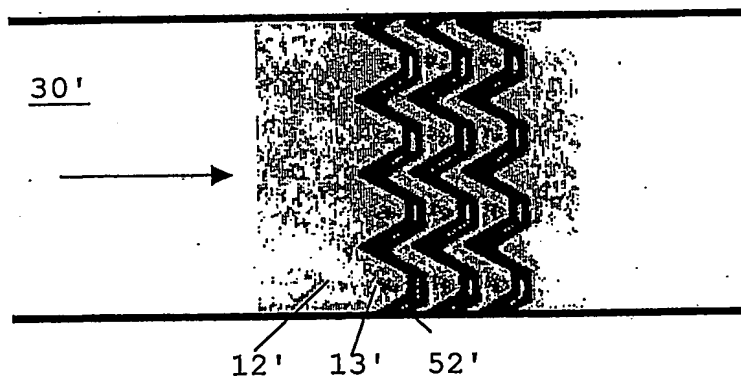
Figur 8



Figur 9



Figur 10
(Stand der Technik)



Figur 11
(Stand der Technik)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**